

## HPLC 指纹图谱和化学模式识别的杜仲盐炙前后对比

吴杭莎<sup>1</sup>, 吕悦<sup>1</sup>, 韦飞扬<sup>1</sup>, 杜伟锋<sup>1,2,3\*</sup>, 李昌煜<sup>1</sup>, 张叶峰<sup>4</sup>, 张光霁<sup>1</sup>, 葛卫红<sup>1,2\*</sup>

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学中药炮制技术研究中心, 浙江 杭州 311401; 3. 浙江中医药大学中药饮片有限公司, 浙江 杭州 311401; 4. 宁波中药饮片有限公司, 浙江 宁波 315016)

**摘要:** **目的** 建立杜仲及盐杜仲的 HPLC 指纹图谱, 利用化学模式识别分析判别生杜仲和盐杜仲, 寻找杜仲盐炙前后差异性特征成分。**方法** 对杜仲及盐杜仲采用 Agilent ZORBAX-Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸, 梯度洗脱; 柱温 35 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 230 nm; 进样量 10 μL。通过聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 对杜仲和盐杜仲进行比较与识别。**结果** 建立了 10 批生杜仲及 10 批盐杜仲的 HPLC-DAD 指纹图谱, 共标定 23 个共有峰, 经对照品比对, 指认出 10 个成分, 分别为京尼平苷酸、绿原酸、咖啡酸、紫丁香苷、京尼平苷、京尼平、松脂醇二葡萄糖苷、中脂素二葡萄糖苷、金丝桃苷和芦丁。通过 HCA、PCA、OPLS-DA 化学模式识别方法可明显将杜仲生品和盐炙品分为 2 类, 筛选出京尼平苷酸、咖啡酸、京尼平、金丝桃苷等 7 个成分可能是杜仲盐炙前后的差异性特征成分。**结论** 建立的指纹图谱方法准确度高, 重复性好, 结合化学模式识别可用于杜仲盐炙前后差异分析。

**关键词:** 杜仲; 盐炙; HPLC 指纹图谱; 化学模式识别

**中图分类号:** R284.1

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2022)12-4072-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.059

杜仲为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮<sup>[1]</sup>, 首载于《神农本草经》<sup>[2]</sup>, 具有强筋骨、补肝肾、安胎等功效。杜仲主要化学成分为木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类等, 其对心血管系统、免疫系统均有调节作用, 同时还能抗衰老、促进骨细胞增殖、抗肿瘤等<sup>[3-4]</sup>。杜仲常盐炙入药, 盐炙有助于引药入肾、增强滋阴降火的作用<sup>[5-6]</sup>。2020 年版《中国药典》对于杜仲药材以及饮片的含量测定指标成分均为松脂醇二葡萄糖苷, 无法体现出杜仲盐炙前后的成分变化; 同时在实际生产中发现, 当杜仲胶炮制断丝时, 松脂醇二葡萄糖苷的含量一般低于标准的限度, 仅检测该指标可能无法判定炮制饮片的质量, 故对杜仲盐炙前后的差异进一步研究, 寻找可用于炮制工艺质量控制的指标成分。

中药指纹图谱在评价中药真伪优劣和确保药材一致稳定方面具有显著优势, 是目前一种有效的中药质量控制方法<sup>[7-8]</sup>。化学模式识别包括聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 等, 能通过降维优化数据, 提高检测准确性<sup>[9-10]</sup>, 化学计量法与

指纹图谱的结合运用, 可有效提升对指纹图谱中数据筛选效率, 已在较多中药研究应用<sup>[11-14]</sup>。杜仲指纹图谱研究近些年多有报道<sup>[15-18]</sup>, 同时也有对杜仲炮制前后指纹图谱研究<sup>[19-20]</sup>, 但尚未见利用化学计量方法对炮制前后指纹图谱的报道。本研究利用 HPLC 建立杜仲生品与盐炙品的指纹图谱, 将炮制前后指纹图谱进行比对, 从整体层面表征炮制前后化学成分变化, 旨在结合指纹图谱与化学模式识别筛选能体现杜仲炮制特色的指标性成分, 以期对杜仲及盐杜仲的质量属性进行有效评价, 为杜仲炮制前后质量标准的建立提供参考。

### 1 材料

U3000 高效液相色谱仪 (美国 ThermoFisher 公司); ME-204E 电子分析天平、NT-XS105 电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); DFT-200 手提式高速中药粉碎机 (温州市林大机械有限公司); DFD-700 电热恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司); KQ-500DB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

京尼平苷酸 (批号 111828-201805, 98.1%)、绿原酸

**收稿日期:** 2022-05-30

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2018YFC1707001); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-H-ZY-45); 宁波市“科技创新 2025”重大专项 (20201ZDYF020069)

**作者简介:** 吴杭莎 (1998—), 女, 研究生, 从事中药炮制及中药药理研究。Tel: 13735552484, E-mail: whs540412@163.com

\* **通信作者:** 杜伟锋 (1984—), 男, 副研究员, 从事中药炮制及质量控制研究。Tel: (0571) 87195895, E-mail: duweifeng200158@sohu.com

葛卫红 (1969—), 男, 研究员, 从事中药药理与新产品开发研究。Tel: (0571) 87195895, E-mail: geweihong@hotmail.com

(批号 110753-201817, 96.8%)、紫丁香苷 (批号 111574-201605, 95.2%)、松脂醇二葡萄糖苷 (批号 111537-201706, 91.7%)、金丝桃苷 (批号 111521-201809, 94.9%)、京尼平苷对照品 (批号 110749-201919, 97.1%)，均购自于中国食品药品检定研究院；京尼平 (批号 21041202, 99.40%)、中脂素二葡萄糖苷 (批号 20031903, 98.46%)，均购自于成都格利普生物科技有限公司；咖啡酸 (批号 110002-202005, 98%)、芦丁 (批号 100080-201811, 98%)，均购自于上海鸿永生物科技有限公司；甲醇购自于美国 Tedia 试剂公司；水为 Milli-Q 超纯水；其余试剂为分析纯。

收集生品杜仲 10 批，购自于浙江中医药大学中药饮片有限公司，编号 SP-1~SP-10；依据浙江中医药大学中药饮片有限公司炮制工艺制备上述生杜仲饮片对应的盐杜仲饮片，编号 YP-1~YP-10。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent ZORBAX-Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相甲醇 (A) -0.1% 磷酸 (B)，梯度洗脱 (0~23 min, 5%~16.5% A；23~35 min, 16.5%~20% A；35~40 min, 20%~21.5% A；40~55 min, 21.5%~24% A；55~70 min, 24%~27.5% A；70~85 min, 27.5%~32.5% A；85~130 min, 32.5%~47% A)；柱温 35℃；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 230 nm；进样量 10 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 取京尼平苷酸、绿原酸、咖啡酸、紫丁香苷、京尼平苷、京尼平、松脂醇二葡萄糖苷、中脂素二葡萄糖苷、金丝桃苷、芦丁对照品适量，精密称定，置于 10 mL 量瓶中，加入 50% 甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，得 24.917、49.368、43.120、11.310、8.739、22.067、24.282、17.328、8.123、31.164 μg/mL 的混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密称取杜仲或盐杜仲粉末 (过 3 号筛) 约 2 g，置具塞锥形瓶中，精密加入 50% 甲醇 50 mL，密塞，称定质量，超声 (40 kHz, 500 W) 40 min，冷却，用 50% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，精密移取 25 mL 续滤液于蒸发皿中，蒸干，用 50% 甲醇定容于 5 mL 量瓶中，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 精密吸取同一批杜仲供试品溶液 (SP-1)，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图。结果显示，以松脂醇二葡萄糖苷为参照峰，各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2%，相对峰面积 RSD 均小于 3%，表明仪器精密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 取同一样品 6 份 (SP-1)，按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，记录色谱图。结果显示，以松脂醇二葡萄糖苷为参照峰，各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2%，相对峰面积 RSD 均小于 3%，表明方法重复性良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一批供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别在 0、5、10、15、20、25 h 进样，记录色谱图。结果显示，以松脂醇二葡萄糖苷为参照峰，各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2%，相对峰面积 RSD 均小于 3%，表明供试品溶液在 25 h 内稳定。

## 2.5 指纹图谱的建立及分析

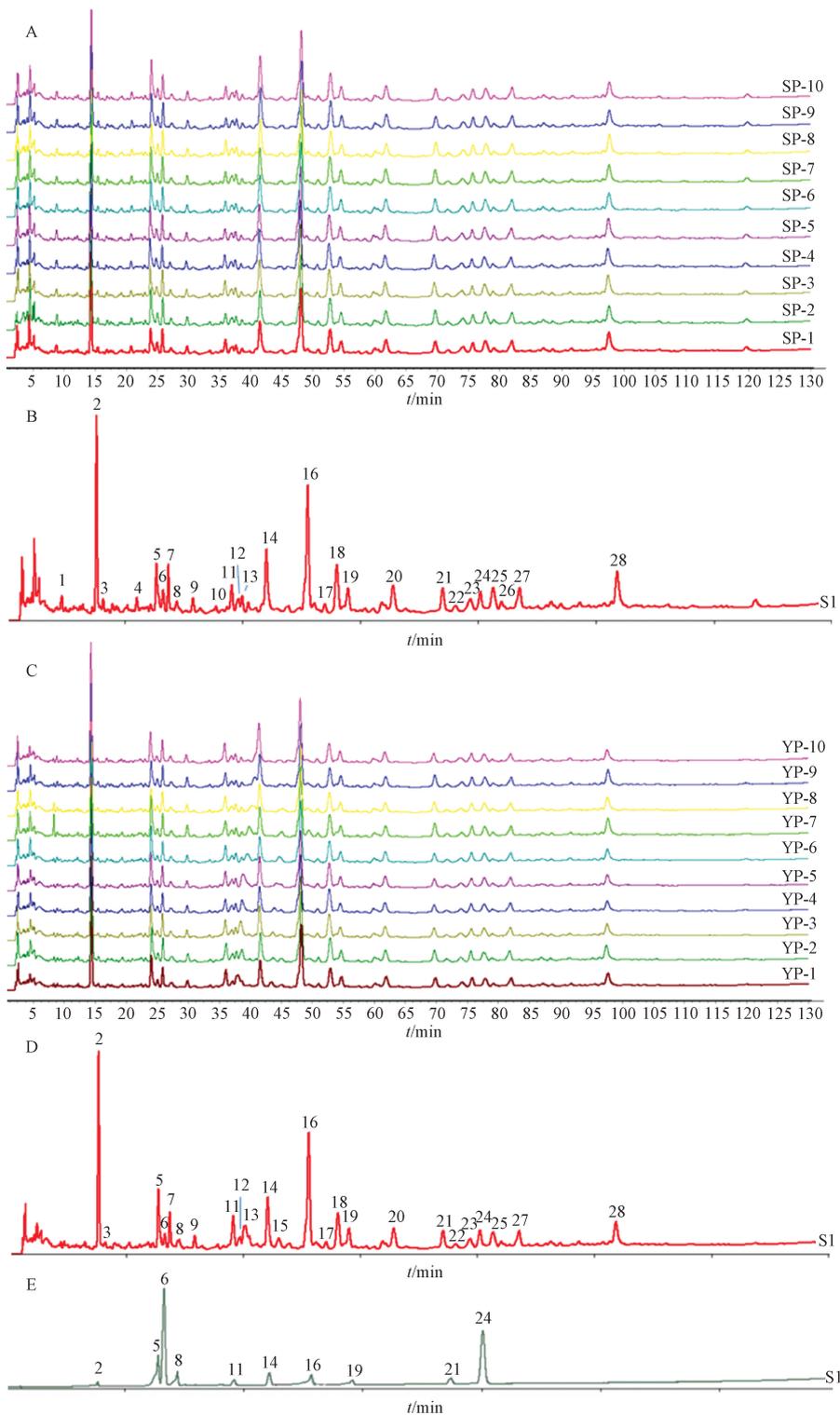
**2.5.1 指纹图谱的建立及相似度分析** 建立杜仲生品、盐炙品的指纹图谱以及各自的对照指纹图谱，如图 1A~1D 所示，生品指纹图谱标定 27 个色谱峰，盐炙品指纹图谱标定 24 个色谱峰，标定 23 个共有色谱峰。将杜仲生品和盐炙品的指纹图谱分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”软件，分别生成对照图谱，计算生品和盐炙品与各自对照图谱的相似度，见表 1。杜仲生品、盐炙品的指纹图谱与各自的对照图谱相似度良好，均在 0.9 以上，同时生品与盐炙品的对照图谱相似度为 0.965，表明各批样品的化学成分一致性较好。经与对照品比对，指认出 10 个成分，分别是京尼平苷酸 (2 号峰)、绿原酸 (5 号峰)、咖啡酸 (6 号峰)、紫丁香苷 (8 号峰)、京尼平苷 (11 号峰)、京尼平 (14 号峰)、松脂醇二葡萄糖苷 (16 号峰)、中脂素二葡萄糖苷 (19 号峰)、金丝桃苷 (21 号峰)、芦丁 (24 号峰)，混合标准品图谱见图 1E。

表 1 指纹图谱相似度

批号	相似度	批号	相似度
SP-1	0.986	YP-1	0.983
SP-2	0.983	YP-2	0.991
SP-3	0.988	YP-3	0.981
SP-4	0.992	YP-4	0.981
SP-5	0.993	YP-5	0.979
SP-6	0.988	YP-6	0.968
SP-7	0.988	YP-7	0.969
SP-8	0.983	YP-8	0.969
SP-9	0.979	YP-9	0.979
SP-10	0.972	YP-10	0.974

**2.5.2 聚类分析** 将 20 个样品的 23 个共有峰的峰面积数据导入 SPSS 25.0 分析软件，采用 Ward 法结合平方 Euclidean 距离作为度量指标，聚类结果见图 2。观察树状聚类图，20 个样品聚为 2 类，SP-1~SP-10 杜仲生品为一类，YP-1~YP-10 杜仲盐炙品为一类，说明生杜仲与盐杜仲能通过聚类分析得到有效判别，进行分类。

**2.5.3 主成分分析** 采用 SPSS 25.0 软件进行主成分因子分析，得到主成分特征值和贡献率结果，见表 2。结果表明，主成分为 5 时，累计贡献率为 83.325% 且特征值为 1.486，提示主成分因子 1~5 可代表杜仲指纹图谱中 23 个共有峰的大部分信息数据。主成分载荷矩阵主要体现各峰对主成分的贡献值，由表 3 可知，多个峰载荷绝对值在各主成分中值较大，说明引起生杜仲与盐杜仲质量差异的化学成分较多。



注：A 为生杜仲指纹图谱；B 为生杜仲对照图谱；C 为盐杜仲指纹图谱；D 为盐杜仲对照图谱；E 为混合对照品图谱。

图 1 HPLC 指纹图谱

将生杜仲与盐杜仲共有峰的峰面积作为变量导入 SIMCA 14.1 统计软件，进行无监督的 PCA 建模分析，结果见图 3，生杜仲和盐杜仲聚为两类，说明杜仲在盐炙后化学成分的总体特征产生明显改变。

2.5.4 正交偏最小二乘法判别分析 将生杜仲和盐杜仲作为研究对象，以共有峰的峰面积作为变量，导入 SIMCA

表 2 主成分特征值和贡献率

主成分数	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	7.939	34.519	34.519
2	4.936	21.462	55.981
3	2.974	12.931	68.912
4	1.847	8.031	76.944
5	1.468	6.382	83.325

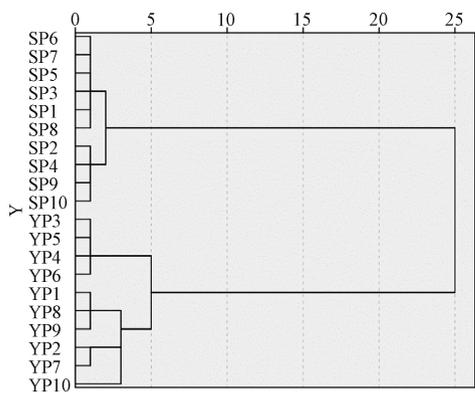


图2 生杜仲与盐杜仲树状聚类图

表3 主成分载荷矩阵

编号	主成分因子				
	1	2	3	4	5
峰2	-0.883	0.282	-0.075	0.014	-0.056
峰3	0.347	0.296	0.569	0.556	-0.071
峰5	-0.269	0.733	-0.077	-0.315	0.110
峰6	0.950	-0.012	-0.113	0.152	-0.013
峰7	0.323	0.809	0.023	-0.285	0.008
峰8	-0.262	0.820	0.256	-0.240	-0.176
峰9	-0.516	0.262	0.621	0.235	0.092
峰11	-0.864	0.138	0.012	0.287	0.275
峰12	0.046	0.536	-0.744	0.237	0.008
峰13	-0.482	0.330	-0.576	0.316	-0.015
峰14	0.310	-0.114	-0.270	-0.046	0.802
峰16	-0.036	0.562	0.353	0.446	0.258
峰17	0.141	0.758	-0.498	0.187	-0.049
峰18	0.494	0.588	-0.515	-0.003	-0.188
峰19	0.328	0.333	0.088	-0.190	0.544
峰20	0.892	0.252	-0.169	-0.146	0.012
峰21	0.833	-0.103	0.066	0.328	-0.161
峰22	0.686	0.467	0.249	0.280	-0.244
峰23	0.775	-0.300	-0.075	-0.206	0.246
峰24	-0.035	0.732	0.432	-0.059	0.280
峰25	0.957	0.139	0.099	-0.155	-0.079
峰27	0.002	0.335	0.418	-0.626	-0.198
峰28	0.836	-0.106	0.317	0.203	0.133

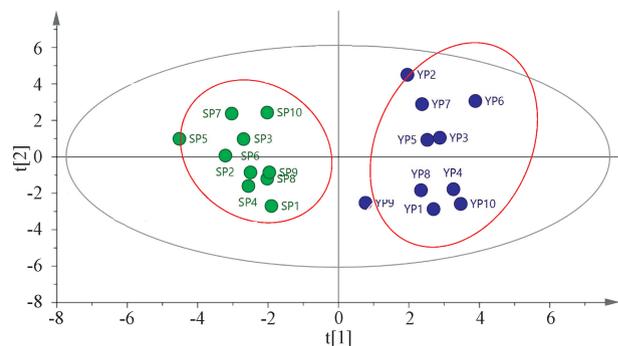


图3 生杜仲与盐杜仲 PCA 得分图

14.1 进行有监督的 OPLS-DA 分析, 结果显示  $R^2X=0.606$ ,  $R^2Y=0.955$ ,  $Q^2=0.908$ , 均大于 0.5, 表示该模型稳定可靠, 可用于生杜仲与盐杜仲的判别。图 4 显示, 杜仲样品与盐炙品分为 2 类, 说明盐炙前后杜仲的化学成分含量发生变化。置换检验显示该模型可靠有效, 未过度拟合, 见图 5。变量重要性投影 (VIP) 是评价各成分对样品分类贡

献度大小的指标, 见下图 6~7。以  $VIP \geq 1$  为依据共筛选出 7 个成分; 以  $|p(\text{corr})| \geq 0.6$  为依据得到 9 个成分。结合两者, 筛选出 7 个成分, 分别为峰 2 (京尼平苷酸)、峰 6 (咖啡酸)、峰 11 (京尼平苷)、峰 20、峰 21 (金丝桃苷)、峰 25、峰 28。因此, 在建立盐杜仲质量标准时, 以上潜在差异性成分可以考虑作为指标成分。

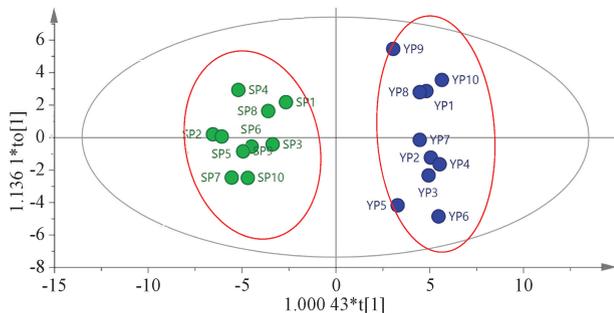


图4 生杜仲与盐杜仲 OPLS-DA 得分图

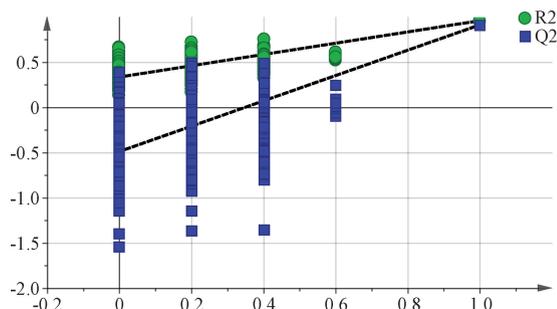


图5 生杜仲与盐杜仲 OPLS-DA 模型置换检验图

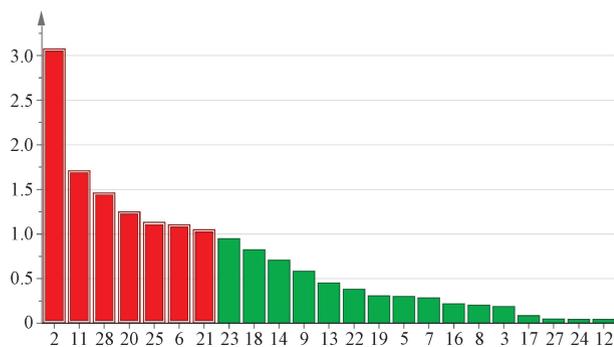


图6 生杜仲与盐杜仲 23 种共有成分 VIP 值图

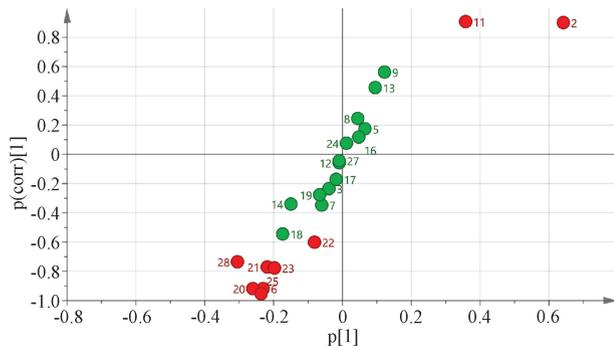


图7 生杜仲与盐杜仲 23 种共有成分 S-plot 图

### 3 讨论

所建立的杜仲 HPLC 指纹图谱, 反映出了杜仲样品与盐炙品的专属性和整体性信息, 在杜仲盐炙过程中化学成

分有新增与减少,但总体变化不大,主要是成分含量上的差异;运用HCA、PCA和OPLS-DA 3种化学模式识别方法对生杜仲和盐杜仲的共有峰数据进行分析,三者均能有效判别生品与盐炙品。在筛选出的杜仲盐炙前后7个差异性成分中指出京尼平苷酸、咖啡酸、京尼平苷和金丝桃苷,其余3个成分还待后续实验进一步分析与指认。这些化学成分对杜仲生品和盐炙品分类具有显著影响,是引起杜仲盐炙前后质量差异的主要潜在标志性成分。因此,在建立生杜仲饮片质量标准时,此差异标志性成分可以考虑作为指标成分,用以对杜仲及盐杜仲的质量进行控制。

综上所述,本研究通过HPLC指纹图谱的建立和化学模式识别方法初步筛选出影响杜仲盐炙前后变化的差异性成分,该方法可对杜仲盐炙前后的质量进行快速比较,为杜仲盐炙前后质量评价提供科学参考,同时也可为生杜仲与盐杜仲药理作用差异的研究建立基础。

#### 参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[2] 孙 夔. 神农本草经[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1982: 114.

[3] 陈启洪, 李晓飞, 段灿灿, 等. 网络药理学探讨杜仲主要活性成分及药理作用机制[J]. 中药材, 2018, 41(2): 419-426.

[4] 冯 晗, 周宏灏, 欧阳冬生. 杜仲的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(6): 713-720.

[5] 张景媛, 鞠成国, 那红宇, 等. 中药盐制法历史沿革研究[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(21): 36-38.

[6] 刘蓬蓬, 张 凡, 赵 远, 等. 中药盐制研究进展[J]. 中国药房, 2013, 24(43): 4101-4104.

[7] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.

[8] 邹纯才, 鄢海燕. 我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法30年(1988-2017年)研究进展与展望[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 1969-1977.

[9] 崔小燕, 杨惠程, 孙千鸿. 化学计量方法在食品安全检测中的应用现状[J]. 食品安全导刊, 2021, 15(6): 173-175.

[10] 尹 燕, 王 森, 阳志强, 等. 化学模式识别在中药炮制中的应用[J]. 中草药, 2021, 52(17): 5369-5377.

[11] 马向慧, 刘 焯, 姜恒丽, 等. 基于聚类分析和主成分分析的吴茱萸及制吴茱萸指纹图谱研究[J]. 中草药, 2022, 53(10): 3171-3177.

[12] 陈 肖, 管红梅, 陈梦林, 等. 基于指纹图谱和多指标成分定量结合化学模式识别法评价不同产地草果质量研究[J]. 2022, 53(1): 3472-3479.

[13] 闫 妍, 侯晓琳, 宿 莹, 等. 基于指纹图谱和化学计量法的生地药材质量评价研究[J]. 中药材, 2020, 43(10): 2482-2486.

[14] 卜晨琛, 李永鹏, 张春平, 等. 基于指纹图谱和化学计量法比较山茱萸的果肉、果核和果梗的成分差异[J]. 中国药师, 2020, 23(11): 2089-2093.

[15] 刘 星, 周 欣, 周 美, 等. 贵州产杜仲高效液相色谱指纹图谱的建立与分析[J]. 医药导报, 2015, 34(1): 84-88.

[16] 范彦博, 袁明洋, 张义生. 四川产杜仲药材高效液相色谱指纹图谱的建立[J]. 医药导报, 2016, 35(10): 1121-1124.

[17] 周 妍, 刘大鹏, 王 薇, 等. 恩施产杜仲药材HPLC指纹图谱的研究[J]. 中国药师, 2014, 17(12): 2071-2074.

[18] 刘 星, 王 玲, 姚 帅, 等. 高效薄层色谱、薄层质谱和HPLC指纹图谱联用技术鉴定杜仲不同部位的化学成分差异[J/OL]. 中草药: 1-10 [2022-05-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20220513.1319.004.html>.

[19] 平 丽, 杨中林, 张 丹, 等. 杜仲生品及盐炙品HPLC指纹图谱比较研究[J]. 中医药学报, 2009, 37(6): 65-68; 130.

[20] 刘可鑫, 周 翎, 刘攀峰, 等. 盐制对杜仲化学成分含量变化的影响[J]. 中成药, 2011, 33(2): 280-284.

## 神曲炮制探讨

于大猛

(中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京 100700)

**摘要:** 古代神曲的切制, 无论罨曲法还是风曲法均是在晾晒后再捣碎, 而非现代罨黄后直接切成小方块。古法显然发酵更充分疗效更优。神曲的炒黄法为古代主流, 炒焦法晚至清代才出现, 二者均以捣碎再炒为佳。炒制的火候以小火为要诀, 在此基础上, 炒黄与研细的工序先后并无明显区别, 但是以前者生产效率更高。生、炒神曲均可煮糊制丸, 以前者煮糊粘度较高, 成丸效果更好。古人治疗痰证呕吐用神曲炒制半夏后, 去半夏用神曲的方法值得借鉴。

**关键词:** 神曲; 炮制; 捣碎; 研细; 炒黄; 糊丸

**中图分类号:** R283

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2022)12-4076-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.060

**收稿日期:** 2020-10-23

**基金项目:** 中国中医科学院科技创新工程(CI2021A00415)

**作者简介:** 于大猛(1972—), 男, 博士, 研究员, 从事本草文献与中药炮制研究。